SUR

N° 12

LES NOUVEAUX PROCÉDÉS

DE DIAGNOSTIC

DES TACHES DE SANG

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 29 Juillet 1909

ACAD. BULGARE BIBL.

PAR

André DASKALOFF

Né à Gorsko-Slivovo (Tirnovo) Bulgarie, le 31 Mai 1880

Pour obtenir le grade de Docteur d'Université

(MENTION MÉDECINE)

MONTPELLIER

IMPRIMERIE GUSTAVE FIRMIN, MONTANE ET SICARDI

Rue Ferdinand-Fabre et quai du Verdanson

1909

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. MAIRET (✲) . . . . . DOYEN
SARDA . . . . . ASSESSEUR

Professeurs

Clinique médicale	MM.	GRASSET (✲) Chargé de l'enseign[t] de pathol. et thérap. génér.
Clinique chirurgicale		TEDENAT (✲).
Thérapeutique et matière médicale. . . .		HAMELIN (✲)
Clinique médicale		CARRIEU.
Cliniquedes maladies mentales et nerv.		MAIRET (✲)
Physique médicale.		IMBERT.
Botanique et hist. nat. méd.		GRANEL.
Clinique chirurgicale.		FORGUE (✲)
Clinique ophtalmologique.		TRUC (✲).
Chimie médicale.		VILLE.
Physiologie.		HEDON.
Histologie		VIALLETON
Pathologie interne		DUCAMP.
Anatomie.		GILIS (✲).
Clinique chirurgicale infantile et orthop.		ESTOR.
Microbiologie		RODET.
Médecine légale et toxicologie		SARDA.
Clinique des maladies des enfants		BAUMEL.
Anatomie pathologique		BOSC.
Hygiène.		BERTIN-SANS (H.)
Pathologie et thérapeutique générales . .		RAUZIER. Chargé de l'enseignement de la clinique médicale.
Clinique obstétricale.		VALLOIS.

Professeurs adjoints : MM. DE ROUVILLE, PUECH, MOURET
Doyen honoraire : M. VIALLETON
Professeurs honoraires : MM. E. BERTIN-SANS (✲), GRYNFELTT
M. H. GOT, *Secrétaire honoraire*

Chargés de Cours complémentaires

Clinique ann. des mal. syphil. et cutanées	MM.	VEDEL, agrégé.
Clinique annexe des mal. des vieillards. .		VIRES, agrégé.
Pathologie externe		LAPEYRE, agr. lib.
Clinique gynécologique.		DE ROUVILLE, prof. adj.
Accouchements..		PUECH, Prof. adj.
Clinique des maladies des voies urinaires		JEANBRAU, agr.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		MOURET, Prof. adj.
Médecine opératoire.		SOUBEYRAN, agrégé.

Agrégés en exercice

MM. GALAVIELLE	MM. SOUBEYRAN	MM. LEENHARDT
VIRES	GUERIN	GAUSSEL
VEDEL	GAGNIERE	RICHE
JEANBRAU	GRYNFELTT Ed.	CABANNES
POUJOL	LAGRIFFOUL.	DERRIEN

M. IZARD, *secrétaire.*

Examinateurs de la Thèse

MM. SARDA, *président.*	GUERIN, *agrégé.*
GRANEL, *professeur.*	DERRIEN, *agrégé.*

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur; qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation

A LA MÉMOIRE

DE MON PÈRE ET DE MA MÈRE

A MA SECONDE MÈRE

A MA FEMME

A MA PETITE OLGA

A MES BEAUX PARENTS

DASKALOFF.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOCTEUR SARDA

PROFESSEUR DE MÉDECINE LÉGALE A L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

DASKALOFF.

A MONSIEUR LE DOCTEUR GUÉRIN-VALMALE

PROFESSEUR-AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

A MONSIEUR LE DOCTEUR DERRIEN

PROFESSEUR-AGRÉGÉ DE CHIMIE MÉDICALE A L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

DASKALOFF.

AVANT-PROPOS

Arrivé à la fin de nos études, il est de notre devoir de remercier publiquement nos maîtres de la Faculté de médecine de Montpellier et des hôpitaux de Nimes où nous avons fait deux ans d'internat.

Que M. le professeur Sarda, président et inspirateur de notre thèse, soit assuré de notre profonde reconnaissance. Nous n'oublierons jamais les conseils qu'il nous a toujours prodigués de si bonne grâce dès le début de nos études et l'intérêt qu'il n'a jamais cessé de nous témoigner.

M. le professeur Granel veut bien faire partie du jury de notre thèse ; nous l'en remercions très respectueusement.

A M. le professeur-agrégé Guérin-Valmale, qui a mis au monde notre premier enfant, nous adressons l'expression de notre bien cordiale gratitude.

M. le professeur-agrégé Derrien a été notre camarade d'études. Il a bien voulu nous fournir quelques indications précieuses pour la première partie de notre travail. Il n'a jamais cessé de nous témoigner son amitié, nous emporterons de lui le meilleur souvenir.

Nous devons une grande reconnaissance à notre ami le docteur Wladimiroff et à Mme Wladimiroff, qui sont pour nous à Montpellier comme un prolongement de notre famille ; leur intimité nous fut précieuse, leur amitié fut pour nous à maintes reprises un réconfort et un refuge.

Loin de Montpellier, nous évoquerons souvent le souvenir de nos amis les docteurs S. Daskaloff, Manol Ivanoff, Stéphanoff, Chaouloff, Borelli et de tous nos camarades français dont nous n'oublierons pas le sympathique accueil.

SUR

LES NOUVEAUX PROCÉDÉS

DE DIAGNOSTIC

DES TACHES DE SANG

INTRODUCTION

Lors de notre passage dans le laboratoire de médecine légale de notre maître M. le professeur Sarda, nous avons été frappé par les nombreuses difficultés que présente le diagnostic des taches de sang en médecine légale. Il arrive souvent que le médecin ou le chimiste-expert sont appelés à démontrer scientifiquement l'existence du sang sur une arme ou sur un objet quelconque. Leurs conclusions ont une influence considérable sur la marche et le résultat de l'instruction judiciaire. Suivant le conseil de notre maître, nous avons eu l'idée de rechercher dans les divers travaux publiés à ce sujet, quels sont les procédés qui offrent le plus de garantie (pour affirmer l'existence du sang dans les taches soumises à l'examen), parmi ceux fondés sur les caractères propres du sang, les réactions qui lui sont particulières (recherche des hématies, re-

cherche de la matière colorante à l'aide de ses propriétés spéciales : optiques, micro-chimiques, etc.). C'est au médecin légiste à savoir les appliquer le mieux possible à chaque cas particulier.

Dans la première partie de notre travail, nous indiquerons sommairement l'état actuel du diagnostic des taches de sang : 1° par l'examen microscopique ; 2° par l'examen spectroscopique ; 3° par les réactions colorées dues aux propriétés oxydantes de l'hémoglobine ou de ses dérivés ferrugineux.

Dans la deuxième partie, nous étudierons les différentes techniques proposées pour l'obtention des cristaux d'hémine, et particulièrement les améliorations apportées par M. le professeur Sarda au procédé classique.

PREMIÈRE PARTIE

1° Examen microscopique

On essaie de retrouver les globules rouges qui sont caractéristiques du sang, mais dans l'immense majorité des cas, cette recherche est inefficace, les globules ayant été altérés ou détruits par la dessiccation, la putréfaction, etc.

Nous devons cependant signaler la récente technique du professeur Florence, de Lyon, qui lui a permis de reconnaître les hématies sur des objets en fer ou en acier. La méthode consiste à examiner la surface de la tache au moyen d'un microscope à éclairage interne ; puis, on fait la photographie de la préparation pour conserver une pièce à conviction.

Pour cet usage, on se sert de l'appareil Florence-Nachet pouvant s'adapter à tout microscope, possédant un pas-de-vis universel. Nous n'insisterons pas davantage sur cette méthode ainsi que sur la description de cet appareil, ne l'ayant jamais expérimenté.

Florence a pu photographier ainsi des globules rouges bien conservés sur le poignard qui avait frappé le président Carnot.

2° Examen spectroscopique

Le spectre le plus sensible et le plus caractéristique de tous les dérivés de l'hémoglobine est le spectre bien connu

de l'*hémochromogène*. Ce spectre est caractérisé par deux bandes d'absorption dans le vert ; la première très foncée ayant son axe au $\lambda = 560$ (Bertin-Sans et Moitessier). La seconde, plus pâle, à bords moins bien délimités, est située entre E et B. La recherche de la première bande suffit.

Pour Poelstra, elle serait encore visible avec une dilution de 1/20,000. Aussi, tous les auteurs modernes sont-ils d'accord pour conseiller cette recherche caractéristique.

On peut obtenir de l'hémochromogène sur des taches de sang par des réducteurs en milieu alcalin. Poelstra conseille d'user de préférence du mélange pyridine et sulfure ammoniaque. M. le professeur-agrégé Derrien se sert d'un excellent réactif, commode et inodore, pour l'obtention de l'hémochromogène : le réactif de Riegler utilisant l'hydrate d'hydrazine comme réducteur. On le prépare de la façon suivante : on dissout 10 grammes de soude caustique dans 100 c. c. d'eau ; on y ajoute 5 grammes de sulfate d'hydrazine et l'on agite jusqu'à dissolution ; on étend alors avec 100 c. c. d'alcool à 95° ; on laisse reposer deux heures et on filtre. Ce réactif donne avec la matière colorante du sang une solution rouge pourpre (hémochromogène) qui, par agitation à l'air devient verte (hématine alcaline) ; ce changement de coloration est si caractéristique qu'il permettrait de conclure à la présence de sang même sans examen spectroscopique.

Examinée au spectroscope, la solution pourpre offrira les bandes d'absorption caractéristiques de l'hémochromogène. Si l'on a affaire à une tache de sang sur étoffe, Riegler conseille de découper un fragment de tache d'environ un demi-centimètre de large et de le placer sur une lame porte-objet ; on l'imbibe de trois ou quatre gouttes de réactif hydrazinique et l'on examine au microscope en

remplaçant l'oculaire par un microspectroscope ; s'il s'agissait bien de sang, les bandes d'absorption caractéristiques de l'hémochromogène apparaissent et permettent de conclure.

3° Réactions colorées

Ces procédés (auxquels on applique plus particulièrement l'épithète de chimiques), sont fondés sur les propriétés oxydantes de l'hémoglobine ou de ses dérivés *ferrugineux*, agissant en présence d'*eau oxygénée* (ou d'essence de térébenthine) sur certains réactifs susceptibles de fournir dans ces conditions des produits colorés, indice d'une réaction positive.

Le type de ces réactifs est la teinture de gaïac utilisée dès 1864 par Van Deen. Dans ces dernières années, il est apparu une foule de succédanés de ce réactif : teinture d'aloès (Sehaer et Rossel) ; solution de gaïacol à un pour cent (Bourquelot et Dupouy), benzidine (O. et R. Adler), solution concentrée de pyramidon dans la pyridine (Poelstra), solution alcaline de phénolphtaline (Kastle et Meyer), etc. Une critique générale de ces procédés a été faite par Willenz (1906) et tout récemment encore par Labat (Gazette des sciences médicales de Bordeaux, 29 novembre 1908).

On sait que la réaction de Van Deen n'est pas spécifique du sang et qu'en médecine légale elle n'a qu'une valeur négative.

La modification de Weber, utile en clinique, a en médecine légale la même valeur que la réaction de Van Deen.

Parmi tous les réactifs récemment proposés, le réactif de Kastle et Meyer jouit actuellement d'un véritable engouement. Nous lui consacrerons donc quelques lignes.

Ce réactif s'obtient en réduisant à chaud par le zinc

une solution potassique de phénolphtaléine. Ce réactif est ainsi composé :

Phénolphtaléine, 2 grammes.
Potasse anhydre, 20 grammes.
Eau distillée, 100 grammes.
Poudre de zinc, 10 grammes.

On fait bouillir jusqu'à décoloration complète. On filtre et on le conserve en flacons bien bouchés et à l'abri de l'air et de la lumière.

On verse successivement et sans agiter dans un tube à essai deux centimètres cubes de liquide à essayer (macerat de tache, etc.), un centimètre cube de réactif et deux à trois gouttes d'eau oxygénée fraîche à 12 volumes. En présence des *moindres traces de sang* le liquide prend une coloration rouge fuchsine très nette (par suite de l'oxydation de la phénolphtaline et phénolphtaléine qui, se trouvant en milieu alcalin, donne la coloration rouge bien connue).

La réaction serait encore appréciable, avec une dilution sanguine au millionième !

Le sang putréfié donne encore la réaction.

Pour Delcarde et Benoît, le sang calciné donnerait encore la réaction, mais Labat, travaillant dans le laboratoire de Denigès, n'a pu vérifier ce fait.

Sans doute le réactif de Kastle et Meyer est d'une grande sensibilité, mais s'il peut par cela même présenter quelques avantages en clinique sur ses succédanés antérieurs, pas plus que ceux-ci et pas plus que le réactif de Van Deen, il n'est *spécifique* du sang.

Comme le montre depuis longtemps le professeur Denigès à son cours, les peroxydases artificielles (par exemple hydrate ferrique, hydrate cuivrique, colloïdaux, etc.) don-

nent la réaction. Il est facile de le vérifier en effectuant, comme l'indique Labat, la réaction de Kastle-Meyer, soit avec un liquide obtenu en mélangeant 1/10 de cent. cube de solution officinale de perchlorure de fer et 50 c. c. de glycérine à 30°, soit avec 2 centimètres cubes de glycérine additionnée de 1 goutte d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 5 0/0.

« Dans une recherche de sang par de pareils procédés, écrit Labat, on ne peut jamais être certain de n'avoir pas dans le milieu où l'on doit opérer un corps pouvant jouer par hasard le rôle de péroxydase. »

« Quand du domaine de la clinique on passe dans celui de la médecine légale, l'emploi de pareilles méthodes est à bannir cette fois très rigoureusement » en tant que méthodes crues spécifiques.

Tout récemment, M. Cestan (Archives médicales de Toulouse, mars et avril 1909), conclut d'une façon analogue après avoir étudié les réactions à la benzidine et à la phénolphtaline : « La médecine légale n'en pourrait obtenir que des renseignements d'ordre négatif, et, en raison de la précision qui lui est nécessaire, devra s'en tenir aux méthodes plus rigoureuses dont elle dispose actuellement. »

Ces méthodes rigoureuses comprennent la recherche du spectre de l'hémochromogène dont nous nous sommes déjà occupé et l'obtention des cristaux d'hémine que nous allons étudier maintenant.

DEUXIÈME PARTIE

PROCÉDÉS MICRO-CHIMIQUES DU DIAGNOSTIC DES TACHES DE SANG PAR L'OBTENTION DE CRISTAUX CARACTÉRISTIQUES.

L'oxyhémoglobine, matière colorante caractéristique du sang, se compose, comme on sait, d'une fraction albuminoïde, inutilisable à notre point de vue, la globine, et d'un pigment ferrugineux, l'hématine, susceptible de fournir dans certaines conditions des dérivés cristallisés permettant de le reconnaître avec certitude.

CHAPITRE PREMIER

CRISTAUX DE TEICHMANN (CRISTAUX D'HÉMINE)

Teichmann (1853), en chauffant du sang avec de l'acide acétique, reconnut au microscope qu'il se formait des cristaux rhombiques dont la couleur varie du jaune rougeâtre au brun sombre. Quelques-uns peuvent atteindre 20 μ, mais la plupart ne dépassent pas 1 μ. Il leur donna le nom de *cristaux d'hémine.*

Brük se servit le premier de ce signe dans une expertise.

Erdmann simplifia le procédé et lui donna à peu près la forme qu'il a encore aujourd'hui ; il n'est pas sans intérêt d'indiquer cette méthode qui fit une époque en médecine légale.

La tache de sang ou l'extrait aqueux de cette tache est déposé, avec une trace de sel marin sur le porte-objet du microscope, puis recouvert d'un verre mince et additionné d'une goutte d'acide acétique concentré. On place le porte-objet de façon à voir la substance solide à travers le microscope. Quand on s'est assuré qu'il n'y a rien de cristallin, on chauffe modérément le porte-objet, soit avec un bec de gaz, soit avec une lampe à alcool, en évitant avec soin tout échauffement de nature à produire un mouvement brusque dans la matière en expérience. Toutefois, il ne faut pas évaporer à siccité ; au contraire, dès que la partie solide n'est plus recouverte du liquide, on remplace celui-ci par une nouvelle goutte d'acide acétique, et à partir de ce moment, on consulte le microscope après avoir laissé refroidir le porte-objet. Il se dépose des cristaux d'hémine ; on les trouve tout près du point où était le sang. Le sang se décolore d'abord sur la circonférence et dans cet espace transparent s'agite une foule de lamelles rhomboïdales qui, suivant leur épaisseur, sont jaunes, rouges ou brunes et plus ou moins transparentes.

Le microscope est mis au grossissement de 3-400 fois, par exemple, objectif 3 et oculaire 2, de Nachet.

On opère directement sur la tache elle-même ou sur le liquide rougeâtre qui résulte de la macération de la tache dans l'eau distillée.

Opération sur le sang desséché et sur la tache elle-même. — 1° Quand l'écaille de sang est très mince, quand la tache est très petite, on place directement cette écaille ou

cette tache sur la plaque de verre ; on s'assure que le sang est parfaitement sec, et si l'on a un doute à cet égard, on chauffe doucement la plaque pour ramener une complète dessiccation ;

2° Un cristal de chlorure de sodium, petit, mais non imperceptible, est placé à côté de la tache ;

3° On dépose ensuite sur la tache avec la baguette, une ou deux gouttes d'acide acétique cristallisable ; on attend un instant que la tache soit bien pénétrée par l'acide ;

4° On chauffe à la lampe jusqu'à évaporation complète de l'acide acétique ;

5° Lorsqu'il ne se dégage plus de vapeurs acides, ce qu'on reconnaît à l'odorat, on examine au microscope et habituellement ón voit les cristaux.

6° Si les cristaux ne sont pas formés, on ajoute de nouveau à la tache une ou deux gouttes d'acide acétique et on évapore comme la première fois.

Opération sur la solution de sang. — 1° *Dissoudre le sang.* — La tache est placée dans un verre de montre, et après une courte macération dans l'eau distillée, on obtient un liquide rougeâtre qui renferme la matière colorante du sang. Si la tache est très petite, on la traite directement sur la plaque par l'eau distillée, et on la traite directement sur la plaque par l'eau distillée, et on attend que la tache soit bien pénétrée et dissoute.

2° *Evaporer le liquide.* — Le liquide rougeâtre ou la tâche imbibée étant déposés sur la plaque, on la chauffe à la lampe pour évaporer le liquide. La précaution recommandée est de ne pas chauffer le liquide à une température supérieure à 60 degrés ; si on dépasse cette température, l'albumine se coagule et forme un résidu grisâtre

qui peut masquer les cristaux. On peut laisser la tache s'évaporer naturellement et attendre quelques heures. En tout cas, il est important qu'elle soit absolument sèche, et le chauffage à la lampe donne, à cet égard, toute garantie.

3° *Ajouter le réactif.* — D'abord un ou deux cristaux de chlorure de sodium bien secs, puis l'acide acétique cristallisable, deux gouttes environ.

4° *Evaporer l'acide.* — En chauffant à la lampe jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de vapeurs d'acide acétique.

5° *Observer au microscope.* — Les cristaux sont nombreux, répandus sur une large surface, mieux isolés que dans les cas précédents.

Cazeneuve indique la série des opérations suivantes, à suivre quand on n'a qu'une petite quantité de matière à sa disposition :

1° On prend un tube effilé à la lampe sur une longueur de un centimètre, de manière que la partie effilée soit capillaire et retienne le liquide par capillarité ; on y verse de l'eau distillée jusqu'au dessus du niveau de la partie renflée.

2° La tache isolée ou enlevée par raclage, est placée à la surface de l'eau dans le tube ; quelques instants suffisent pour que des stries de matière colorante se détachent.

3° On souffle par la grosse extrémité une goutte de ce liquide sur la plaque du microscope.

4° On y ajoute une goutte de solution de sel marin à un millième.

5° On fait évaporer doucement jusqu'à siccité, en évitant de chauffer trop pour que l'albumine ne se trouble

pas, la coagulation albumineuse étant défavorable à la formation des cristaux d'hémine.

6° On recouvre cette goutte, réduite à une gustule, d'une lamelle de verre.

7° On apporte une goutte d'acide acétique anhydre, qui gagne la matière colorante, par capillarité, entre les deux plaques.

On fait bouillir avec précaution et on regarde au microscope; si on ne voit pas de cristaux, on ajoute une nouvelle goutte d'acide acétique glacial et on chauffe encore ; à ce deuxième essai les cristaux se forment.

Denigès, dans son Manuel opératoire des travaux pratiques de chimie biologique de la Faculté de Bordeaux (3e édition, 1907, p. 19), attire l'attention sur l'importance de certains tours de main pour la bonne obtention des cristaux de Teichmann.

On cherche à obtenir, par la superposition de deux gouttes (de macérat sanguin), successivement et concentriquement évaporées, « une tache présentant une sorte d'excavation annulaire entre ses bords et son centre, car dans ces conditions seules, l'acide acétique reste adhérent par capillarité en donnant une zone annulaire liquide, plus ou moins complète, suivant le degré de perfection de la préparation, laquelle zone se sature d'hémine parce qu'elle résiste la dernière à l'évaporation et, par refroidissement, abandonne des cristaux concentrés sur un espace très faible ». Il faut que la tache centrale, sans être trop considérable, soit assez grande pour laisser une zone annulaire assez étroite. L'acide acétique est évaporé avec les précautions habituelles, mais il faut laisser refroidir avant d'atteindre le moment où l'acide retenu par capillarité par le résidu sanguin, et qui résiste le dernier à l'évaporation, soit tout à fait évaporé ; on obtient alors facilement de beaux cristaux de Teichmann.

CHAPITRE II

OBTENTION DE CRISTAUX D'HÉMOCHROMOGÈNE

Les cristaux de Teichmann ont une composition chimique sur laquelle on n'est pas encore fixé : chlorhydrate d'hématine pour les uns (opinion classique), éther chlorhydrique de l'hématine pour les autres (Lieber), chlorhydrate d'acétylhématine pour d'autres (Schalfejeff), mais ils dérivent de l'hématine.

L'hématine elle-même n'a pas encore été obtenue à l'état cristallisé. La soi-disant hématine cristallisée de MM. Piettri et Vila (C. R. 1907), est très certainement un éther formique. Par contre, l'*hémochromogène* (produit de réduction de l'hématine en présence de matières albuminoïdes ou de sels ammoniacaux), est susceptible de cristalliser. Ces cristaux ont été proposés pour la caractérisation microchimique du sang en médecine légale. Il faut arriver à Donogany (1892) pour avoir un mode facile d'obtention des préparations microscopiques d'hémochromogène. Sur la lame porte-objet, il dépose une goutte de sang défibriné, ou une goutte d'une dissolution de tache sanguine, et il la traite successivement par une goutte de pyridine et une autre de sulfure d'ammonium.

Il obtient ainsi des cristaux d'hémochromogène, même avec du sang qui datait d'un grand nombre d'années.

A l'aide des mêmes réactifs et en procédant, soit avec

du sang frais, soit avec du sang desséché, de Dominicis observa également les cristaux d'hémochromogène. Il remarqua que le sang ancien donnait aussi facilement des cristaux, mais que ceux-ci avaient des formes moins parfaites.

Cevidalli, pour obtenir les cristaux d'hémochromogène, se contente d'ajouter une goutte de pyridine à une goutte de sang.

De Dominicis améliore le procédé d'obtention des cristaux d'hémochromogène en remplaçant le sulfure ammoniaque par l'hydrazine. On pulvérise finement un peu de la tache sèche sur une lame porte-objet. On imbibe avec une petite goutte de pyridine et l'on triture un moment pour faciliter l'inhibition. On ajoute alors une petite goutte d'une solution saturée de sulfate d'hydrazine, récemment préparée, l'on place le couvre-objet et on chauffe au-dessus de la flamme jusqu'à coloration pourpre et jusqu'à dégagement de quelques bulles, et l'on examine au microscope.

CHAPITRE III

PROCÉDÉ DE LECHA-MARZO, MODIFIÉ PAR CAFFORT ET SARDA

Le docteur Lecha-Marzo (de la Faculté de médecine de Valladolid) reproche aux procédés d'obtention de cristaux d'hémochromogène de donner des cristaux très petits, sans contours nets, et qui disparaissent de la préparation au bout de quelques heures. Il propose, pour remédier à ces inconvénients, l'addition d'une solution d'iode qui, en agissant sur l'hémochromogène donne des cristaux d'iodo-hématine.

Si l'on fait agir sur du sang la pyridine et le sulfure d'ammonium, on obtient de l'hémochromogène. En traitant cet hémochromogène par une solution d'iode, il se forme de l'iodo-hématine. Tel est le procédé indiqué par Lecha-Marzo. Il emploie de préférence une solution alcoolique d'iode, mais l'emploi des solutions alcooliques présente les inconvénients suivants : quand on dépose une goutte sur la tache évaporée, celle-ci s'imbibe rapidement et le réactif se répand plus ou moins loin tout autour d'elle. Lorsqu'on ajoute la pyridine et le sulfure d'ammonium, le mélange se fait mal, et l'on a souvent des préparations faites dans de mauvaises conditions, qui ne donnent aucun résultat.

Le docteur Caffort, dans sa thèse, inspirée par M. le pro-

fesseur Sarda, dit qu'il a expérimenté le procédé du docteur Lecha-Marzo pour obtenir des cristaux d'iodo-hématine, et qu'il s'est heurté tout d'abord aux inconvénients suivants : dissolutions des cristaux par excès de réactif, surtout lorsque les taches étaient anciennes ; d'autres fois, le fond des préparations était si foncé que les cristaux n'apparaissaient plus et qu'il fallait difficilement chercher un point de la préparation assez clair pour les apercevoir distinctement. Les préparations montrent un mélange de cristaux d'hémochromogène et d'iodo-hématine. La couleur des cristaux varie du rouge violacé de l'iode au rouge vif. Ce sont des bâtonnets rhomboïdaux ou de petites tablettes rectangulaires. On observe des étoiles formées de cristaux en aiguilles, apparaissant souvent incurvés.

M. le professeur Sarda a eu l'idée de remplacer la solution de Lecha-Marzo par l'eau iodée et d'essayer, en même temps que celle-ci, ses voisines : l'eau chlorée et l'eau bromée.

Les résultats, relatés dans la thèse de Caffort et dans une communication à l'Académie des Sciences, furent satisfaisants.

Cependant, il faut reconnaître qu'en plus des inconvénients déjà signalés, ce procédé présente le défaut de rendre l'examen des préparations désagréable du fait de l'odeur de la pyridine et des vapeurs du sulfure d'ammonium ; c'est pourquoi M. le professeur Sarda s'est demandé si le procédé de Teichmann n'était pas susceptible de perfectionnements qui le rendraient plus facile pour les experts inexpérimentés. C'est ainsi que les résultats obtenus avec l'eau iodée et l'eau bromée ont conduit MM. Sarda et Düsser à expérimenter les iodures et les bromu-

rés pour remplacer le chlorure de sodium dans la technique de Teichmann ; mais avant d'exposer les très bons résultats de la technique du professeur Sarda, nous exposerons brièvement les tentatives antérieurement faites dans la même direction par MM. Husson et Cazeneuve.

CHAPITRE IV

PROCÉDÉ DE HUSSON ET DE CAZENEUVE ; LEUR COMPARAISON

Husson, pharmacien à Toul, a communiqué ses recherches à l'Académie des sciences en 1875.

Il utilisait la technique de Teichmann en remplaçant la solution de chlorure de sodium, soit par une solution d'iodure de potassium, *au vingtième,* soit par une solution de bromure de potassium au 1/20.

Avec l'iodure de potassium, Husson obtint des cristaux analogues à ceux d'hémine, mais *plus foncés* et présentant une teinte violacée. Cet auteur pense que ces cristaux sont dus à la formation d'hémine iodée ou iodhydrate d'hématine. Comme les cristaux (hémine chlorée), ils appartiennent au système rhomboïdal et se présentent souvent sous la forme de bâtonnets qui s'entrecroisent et semblent former des étoiles ou des croix de Malte.

Avec le bromure de potassium, Husson obtint des cristaux analogues aux précédents, mais ayant généralement une teinte rosée et qu'il regarde comme formés d'hémine bromée.

Cazeneuve, dans sa thèse sur l'hématine, Paris, 1876, critique le travail de Husson, auquel il trouve deux vices fondamentaux : 1° n'avoir pas éliminé les chlorures ; 2° n'avoir pas justifié la composition de ses cristaux par

l'analyse chimique. Cazeneuve pense que les cristaux obtenus par le sang ne seraient autres que des cristaux habituels de Teichmann, formés à la faveur du chlorure contenu dans le sang. L'hématine serait, en effet, pour Cazeneuve, un réactif des chlorures presque aussi sensible que le nitrate d'argent ; il est donc inutile pour Cazeneuve de recourir à des solutions salines, qui doivent aux chlorures la propriété de donner de l'hémine.

M. le professeur Sarda pense que Cazeneuve a tort d'identifier les cristaux de Husson aux cristaux de Teichmann. Comme nous allons le voir, leur coloration, leur dimension, leur obtention plus facile les différencient des cristaux d'hémine.

CHAPITRE V

OBTENTION DES CRISTAUX D'HÉMINE PAR LES IODURES ET LES BROMURES ALCALINS

(Procédé de MM. Sarda et Dusser)

Après de nombreux essais, MM. Sarda et Dusser ont adopté les solutions *au millième* d'iodure ou de bromure de sodium et de potassium pour remplacer la solution de chlorure de sodium dans la technique de Teichmann. Avec des solutions plus concentrées, les préparations manquent de netteté ; avec des solutions plus étendues, les cristaux sont moins nombreux.

Les solutions au vingtième proposées par Husson donnent des préparations bien inférieures.

Voici la technique du professeur Sarda :

Une goutte de dissolution sanguine est évaporée lentement sur une lame porte-objet. On place sur le résidu une petite goutte d'une solution d'iodure ou de bromure et on évapore à nouveau à une température qui ne doit pas dépasser 60 degrés environ. On recouvre d'une lamelle sur les bords de laquelle on place une goutte d'acide acétique cristallisable, on l'évapore une dernière fois et on observe au microscope.

Dans cette dernière partie de l'opération, les débutants ont l'habitude d'évaporer trop rapidement, l'acide acétique entre vite en ébullition et les bulles chassent les cris-

taux en formation à la périphérie, où on les voit groupés en masse plus ou moins compacte et colorée. Nous aimons mieux les préparations lentes.

Il nous arrive même souvent, surtout avec les iodures, d'arrêter l'évaporation alors qu'il reste encore un peu de liquide. Parfois les cristaux sont plus nets, plus volumineux et les préparations plus élégantes. Il n'est même pas rare de voir des cristaux dans tous les points, tandis qu'en évaporant rapidement et complètement, c'est parfois en dehors de la lamelle qu'il faut les chercher, et, dans ce cas, on ne peut pas conserver la préparation.

Tous les cristaux d'iodo-hématine ont une jolie couleur violet-brun. Avec le bromure de potassium, la coloration est moins vive.

Avantages de la technique du professeur Sarda. — Un premier point à mettre en lumière est le suivant : les bromures et les iodures donnent des cristaux *plus gros et mieux colorés* que les chlorures ; ils sont aussi *plus nombreux, mieux répartis* sous la lamelle et, par suite, *vite trouvés.*

D'autre part, le procédé est plus *sûr,* car il est d'une réussite plus facile. En effet, les étudiants qui échouaient régulièrement avec le chlorure de sodium, réussissaient du premier coup avec les iodures et les bromures, sans jamais avoir besoin d'ajouter une nouvelle goutte d'acide acétique.

C'est incontestablement l'iodure de potassium qui a donné les résultats les plus constants et les meilleurs, même avec des taches très petites et à peine visibles. C'est donc l'*iodure de potassium* que MM. Sarda et Dusser recommandent aux experts.

La méthode à l'iodure de potassium est particulièrement recommandable pour la caractérisation des taches de sang depuis longtemps converties en rouille ; les cristaux d'iodo-hématine nets et d'un violet presque noir se détachant bien sur le fond orangé que donne la rouille.

CHAPITRE VI

EMPLOI DES IODURES ET BROMURES D'AMMONIUM ET DE STRONTIUM

(MM. Sarda et Ratcheff)

Monsieur le professeur Sarda et son préparateur bénévole, le docteur Ratcheff, ont obtenu, avec les iodures d'ammonium et de strontium, de très beaux cristaux comparables comme volume et coloration à ceux que donne l'iodure de potassium. En opérant avec du sang ancien en dissolutions très étendues et des solutions iodurées ou bromurées *au millième*, nous avons à préciser nous-même la simplicité avec laquelle on obtient de belles préparations analogues aux photographies publiées par MM. Sarda et Ratcheff dans le Bulletin de la Société de médecine légale de France (1909) ; du reste, tous les élèves qui ont suivi les travaux pratiques de médecine légale à la Faculté de Montpellier ont pu se convaincre de la supériorité des techniques, récemment établies par M. le professeur Sarda. Les sels d'ammonium et ceux de strontium donnent d'aussi bons résultats que les sels de potassium.

Les sels de potassium, de sodium et de strontium supportent sans inconvénients l'adjonction successive de plusieurs gouttes d'acide, ce qui rend les préparations plus claires. Avec les sels d'ammonium, il faut éviter d'ajouter plusieurs fois de l'acide, et surtout ne pas chauffer jusqu'à l'ébullition.

CONCLUSIONS

A. Il n'y a en médecine légale que trois procédés rigoureux qui permettent de conclure à la présence de sang dans une tache :

1° La mise en évidence des globules rouges ;

2° L'obtention du spectre caractéristique de l'hémochromogène ;

3° L'obtention de cristaux de Teichmann ou de dérivés analogues.

B. Les réactions colorées dues aux propriétés peroxydasiques de la partie ferrugineuse de la matière colorante du sang *ne sont pas spécifiques* et ne peuvent avoir en médecine légale qu'une valeur négative.

Il faut se mettre en garde contre l'engouement dont jouit actuellement en France la réaction de Meyer (oxydation de la phénolphtaline). Cette réaction est certes très sensible et peut rendre des services en clinique, mais en médecine légale, elle a la même valeur que le bleuissement de la teinture de gaïac (nécessaire, mais pas suffisante).

C. Comme l'examen histologique et l'examen spectroscopique ne sont pas toujours applicables, ce sera, dans la grande majorité des cas d'expertise médico-légale, l'obtention de cristaux caractéristiques, qui donnera des résultats certains et incontestables.

1° Le procédé de Lecha-Marzo est un élégant procédé de

laboratoire, mais inférieur, au point de vue pratique, à celui de Teichmann. On peut en rapprocher les modifications apportées par Sarda et Caffort.

2° Les dernières modifications apportées au procédé de Teichmann (substitution au chlorure de sodium des bromures et iodures de potassium, sodium, ammonium) constituent un perfectionnement de nature à rendre facile le diagnostic des taches de sang. Ces modifications sont dues au professeur Sarda ; nous en avons constaté personnellement les avantages réels.

BIBLIOGRAPHIE

Husson. — Académie des sciences, 1875.

Cazeneuve. — Thèse, Paris, 1876.

Dechambre. — Dictionnaire encyclopédique de sciences medicales. MDCCCLXXVIII.

Wurtz. — Deuxième supplément au Dictionnaire de chimie, article hémoglobine par Lambling, 1902.

Riegler. — Nachweiss der Blutfarbstoffe mittels Hydrazin. Zeitschr. f. analyt. Chem. 43 (1904), 539.

Caffort. — Sur un nouveau procédé d'obtention des cristaux d'hémine. Thèse, Montpellier, 1906.

Dominicis. — Un nuovo et migliore modo per ottenere i cristalli di emavomogeno. Gazz. Intern. di Medic., mars, 1906.

Sarda et Caffort. — Académie des sciences, t. CXLIII, 1906. Sur un nouveau procédé d'obtention des cristaux d'hémine.

Willenz. — Sur la recherche du sang par les procédés chimiques (Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, juillet 1906, pages 202-214).

Lecha Marzo. — Sobre nuestros procedimentos para el Diagnostico médico-légal de las Manchas de sangre. Madrid, 1907.

Poelstra. — Klinische methoden voor het opsporen von bloed. Thèse Doctorat, Amsterdam, juillet 1907.

Labat. — Sur la recherche du sang en clinique et en médecine légale. Gazette hebdomadaire des sciences médicales de Bordeaux, n° 48, 1908.

Sarda. — Résultats comparatifs des nouveaux procédés pour l'obtention des cristaux d'hémine. Bulletin Soc. Méd. Lég. de France, 9 novembre et 14 décembre 1908.

Barral. — Précis d'analyse chimique, biologique, pathologique et clinique. Paris, 1909.

CESTAN. — La recherche du sang par les procédés de la benzidine et de la phénolphtaline (Archives médicales de Toulouse, mars et avril, 1909)

SARDA et DUSSER. — Obtention des cristaux d'hémine par les iodures et les bromures alcalins, Montpellier, 1909, Montpellier Médical.

SARDA et RATCHEFF. — Obtention des cristaux d'iodo-hématine et de bromo-hématine par les iodures et les bromures d'ammonium et de strontium, 1909, Bulletin de Médecine légale.

MOREL. — Technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux. Collection Testut, 1909.

Vu et permis d'imprimer
Montpellier, le 23 juillet 1909.
Le Recteur,
Ant. BENOIST.

Vu et approuvé
Montpellier, le 23 juillet 1909.
Le Doyen,
MAIRET

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

SUR

LES NOUVEAUX PROCÉDÉS

DE DIAGNOSTIC

DES TACHES DE SANG